

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CONTRA BRUCELOSIS EN HATOS BOVINOS DE LA
REGIÓN DE BLUE CREEK, ORANGE WALK, BELICE**

ANDRE ANGELO DEPAZ

Médico Veterinario

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CONTRA BRUCELOSIS EN HATOS BOVINOS DE LA REGIÓN DE
BLUE CREEK, ORANGE WALK, BELICE**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

ANDRE ANGELO DEPAZ

Al conferírsele el título profesional de

Médico Veterinario

En el grado de licenciado

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2015

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA**

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	M.Sc. Juan José Prem González
VOCAL II:	Lic. Zoot. Edgar Amílcar García Pimentel
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Andrea Analy López García

ASESORES

M.Sc. FREDY ESTUARDO GONZÁLEZ GUERRERO

M.A. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA BRUCELOSIS EN HATOS BOVINOS DE LA REGIÓN DE BLUE CREEK, ORANGE WALK, BELICE

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Por haberme dado salud y vida para lograr mis objetivos y por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.
- A MIS PADRES:** Por estar siempre a mi lado, a quienes debo todo en la vida, les agradezco el cariño, amor y paciencia que me brindaron siempre. Se merecen esto y mucho más.
- A MI HERMANO:** Por haberme apoyado en todo momento, te quiero mucho y que Dios te bendiga siempre.
- A MIS ABUELAS:** Quienes desde el cielo guían mi camino, las quiero mucho y siempre estarán en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A MI PADRE: Por ser mi guía y mi ejemplo a seguir, orgulloso de seguir tus pasos.

A MI MADRE: Por haberme apoyado en todo momento, nunca estuve solo, gracias madre por el amor y cariño que me brindaste siempre.

A MI HERMANO: Por estar siempre presente en mi vida, te quiero mucho.

A MI FAMILIA: Por darme todo el cariño en el mundo y siempre estar pendientes de mi, los amo a todos.

A MI ABUELO: Por su apoyo incondicional, por sus palabras, mil gracias abuelo.

A MIS AMIGOS: Por su comprensión y apoyo, mil gracias por hacer cada momento especial, siempre nos estuvimos ahí uno para el otro, gracias Leo, David, Carlos, Fernando, Javi, Pablo Lucero, Chucky, Catracho, Mariano, Capeto, Javier Vásquez, Choco, Pablo Puga, Jairo, Pime, Guni, Álvaro, Angel, Diego, Brian, Bobby, Zane, Daren, Raiza, Myra, Misha, Adriana, Vary, Liz, Melissa, Gaby, Erika, Claudia, Mane, Polla, Ale, Nandy, Pao, Miriam, Judith, Debbie, Alejandra, China, Wycha, Yagni, Melanie; muchas gracias, los quiero mucho.

A MIS MAESTROS: Gracias a cada uno de ustedes, por su tiempo, por su apoyo y sus enseñanzas que me transmitieron en el

desarrollo de mi formación profesional, siempre estuvieron dispuestos a ayudar, gracias Dr. Fredy, Dr. Camey, Dr. Rodríguez, Dr. Ludwig, Dr. Chejon, Dr. Rafita, Dr. Yeri, Lic. Amílcar, Dr. Prem, Dr. Orellana, Dr. Llerena, Dr. Estrada, Dr. Lima, Dr. Gudiel, Dr. Gongora, Dra. Jacqueline, Dra. Carbonell, Dra. Arizandieta, Dra. Santizo, Dra. Zea; muy agradecido y mucha bendición a todos.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	3
	2.1 Objetivo General.....	3
	2.2 Objetivos Específicos.....	3
III.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
	3.1 Etiología.....	4
	3.2 Distribución geográfica.....	4
	3.3 Fuente de infección.....	4
	3.4 Transmisión.....	5
	3.5 Período de incubación.....	7
	3.6 Patogenia.....	7
	3.7 Signos clínicos.....	8
	3.8 Lesiones post mortem.....	8
	3.9 Tratamiento.....	9
	3.10 Control y erradicación.....	9
	3.11 Diagnóstico.....	10
	3.11.1 Identificación del agente etiológico.....	11
	3.11.1.1 Métodos de tinción.....	11
	3.11.1.2 Cultivo.....	12
	3.11.1.2.1 Medios de cultivo bacteriológico...	12
	3.11.1.3 Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos.....	13
	3.11.2 Pruebas serológicas.....	13
	3.11.2.1 Prueba de tarjeta o rosa de Bengala.....	15
	3.11.2.2 Prueba de Rivanol.....	15
	3.11.2.3 Prueba de fijación de complemento.....	16
	3.11.2.4 Prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA).....	18

3.12	Análisis de riesgo.....	18
3.12.1	Algunas de las consideraciones para mantener su hato libre dela brucelosis son.....	19
3.13	Medidas de concordancia para variables cualitativas Kappa.....	20
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1	Materiales y equipo.....	25
4.1.1	Personal.....	26
4.1.2	Infraestructura.....	26
4.2	Metodología.....	27
4.2.1	Toma de muestras.....	28
4.2.1.1	Procedimiento de card test.....	28
4.2.1.2	Procedimiento de Rivanol.....	29
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
VI.	CONCLUSIONES.....	35
VII.	RECOMENDACIONES.....	36
VIII.	RESUMEN.....	37
	SUMMARY.....	38
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No. 1	
Medidas de concordancia para variables cualitativas –Kappa-.....	21
Cuadro No. 2	
Márgenes para valorar el grado del índice Kapa.....	23
Cuadro No. 3	
Resultados obtenidos con las pruebas utilizadas.....	30
Cuadro No. 4	
Resumen de resultados.....	30
Cuadro No. 5	
Prueba de Kappa.....	31
Cuadro No. 6	
Asociación entre la prevalencia y sexo.....	31
Cuadro No. 7	
Asociación entre la prevalencia y edad.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1

Etapas del análisis de riesgos.....	19
-------------------------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una zoonosis que causa grandes pérdidas económicas y además una vez presente afecta el comercio de bovinos en pie. En Belice no existen estudios de la situación de Brucelosis bovina, esto debido a que no se ha investigado en una forma sistemática. Se piensa que la prevalencia es baja debido al manejo en pastoreo y su baja densidad animal, se sospecha que existe el riesgo debido al transporte de animales de Guatemala a México. A pesar de esto en Belice no se vacuna contra brucelosis.

Alrededor de 1985 se realizaron pruebas de Rivanol en aproximadamente tres mil cabezas de ganado, las cuales dieron resultado negativo. En la actualidad la información se limita a entrevistas a ganaderos y médicos veterinarios de Belice. Estos confirman que no han evidenciado signos de infecciones por brucelosis. Sin embargo, esto no resuelve las incertidumbres en cuanto al estatus sanitario de la población bovina de Belice, la cual se ha podido ver influida por las importaciones ilegales de bovinos.

Debido a la falta de un mercado que permite la exportación formal, la industria ganadera no ha podido desarrollarse. El comercio de ganado vivo ha sido informal con países como Guatemala y México. Es decir que existe la exportación de ganado vivo para sacrificio desde Belice hacia México o desde Belice hacia Guatemala por la vía de contrabando. Los animales entran a México por puntos de entrada no oficiales y sin certificación sanitaria. Se estima que alrededor de 100 animales son exportados a México y Guatemala diariamente. Los animales exportados a Guatemala también llegan a México como destino final. Por estas razones México está realizando acuerdos de entendimiento con los países de la región centroamericana para facilitar la importación de ganado vivo. Los acuerdos de entendimiento se enfocan en que los animales a exportar se encuentren libres de brucelosis y de tuberculosis, y que presenten un sistema de trazabilidad, entre otros.

Se determinó la zona de Blue Creek, Orange Walk como la zona bajo investigación. *Blue Creek* es una comunidad en la parte norte de Belice situada en el Distrito de Orange Walk. Existe solo un camino principal que conecta con el resto del país y solamente el río “Río Hondo” lo separa de México. En esta zona se encuentran alrededor de 85 ganaderos con una población bovina de aproximadamente 20,000 cabezas de ganado bovino, estos son mayormente de raza cebu (*Nelore, Brahman*), con un manejo de producción extensiva. El manejo sanitario es enfocado al control de parásitos internos y externos y vacunación contra enfermedades clostridiales. Los programas oficiales incluyen Rabia, Encefalopatía Espongiforme Bovina, enfermedades vesiculares y Brucelosis por medio de sintomatología. Es decir que existen sistemas de vigilancia activa para el control o detección temprana de estas enfermedades. El gobierno de Belice determina de forma oficial los protocolos para controlar estas enfermedades y proporciona los recursos necesarios para dar seguimiento a la vigilancia de las mismas.

Blue Creek es una comunidad en donde los ganaderos están muy organizados lo cual ha contribuido a un buen desarrollo de la comunidad.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Generar información acerca de la prevalencia de brucelosis en hatos bovinos de la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de animales seropositivos a *Brucella abortus* en hatos bovinos de carne y leche en la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice por medio de la Prueba de Tarjeta.
- Establecer la presencia de animales seropositivos a *Brucella abortus* en hatos bovinos de carne y leche en la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice que dieron positivo a la Prueba de Tarjeta, por medio a la Prueba de Rivanol.
- Confirmar la presencia de animales seropositivos a *Brucella abortus* en hatos bovinos de carne y leche en la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice que dieron positivo a la Prueba de Tarjeta y Prueba de Rivanol, por medio a la Prueba de fijación de Complemento.
- Establecer la concordancia entre los resultados de las tres pruebas utilizadas.
- Determinar asociación entre la prevalencia y las variables edad, sexo y raza.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Etiología

En las vacas, *Brucella abortus* es la causa de la brucelosis, y otras especies de *Brucella* como *B. melitensis* y *B. suis* pueden, rara vez, infectar a las vacas. *Brucella abortus* es un bacilo corto Gram-negativo que es muy exigente y crece mejor en un medio aeróbico enriquecido con CO₂. Poseen un tamaño de 0.5 um x 0.6-1.5 um. Su envoltura celular está formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Este contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopéptido denominado peptidoglucano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido considerado el principal antígeno (Blood, 1982, Rebhun, 1995, Stanchi, 2007).

3.2 Distribución geográfica

La brucelosis se encuentra en todo el mundo pero está controlada en la mayoría de los países desarrollados. La enfermedad clínica todavía es común en el Medio Oriente, Asia, África, América Central y del Sur, Cuenca Mediterránea y el Caribe. Las especies de brucela varían en su distribución geográfica. *B. abortus* se encuentra en todo el mundo, en las regiones ganaderas con excepción de Japón, Canadá, algunos países europeos, Australia, Nueva Zelanda e Israel, donde ha sido erradicada (CFSPH, 2009).

3.3 Fuente de infección

La fuente primaria de infección está representada por las hembras grávidas que, al abortar o parir, expulsan grandes cantidades de brucelas con el feto, el líquido amniótico y las membranas fetales. También pueden difundir la enfermedad las hembras que, poco después de abortar, eliminan brucelas con la

secreción vaginal, y vacas que al parecer sanas, segregan leche que contienen brucelas. En menor grado pueden contribuir a la contaminación del campo las materias fecales de terneros que se alimentan de leche contaminada, ya que no todas las brucelas se destruyen en el tracto digestivo. Los toros sin infección no la contraen por cubrir a vacas infectadas, pero sí la tienen, pueden infectar a éstas, aunque muy raras veces. En las demás especies, ocurre en forma similar. Las secundarias más importantes desde el punto de vista práctico lo constituyen las membranas fetales, el líquido amniótico y el feto infectado, pues contienen cantidades enormes de brucelas y pueden infectar fuertemente la cama y el suelo de los establos, el pienso y hasta en algunas circunstancias de mala higiene y cuidado, el agua de bebida. A la infección de los establos puede contribuir también la leche, pues, aproximadamente la mitad de las vacas infectadas, después de abortar o parir, eliminan brucela con la leche durante semanas, meses y años; sobre todo en aquellas salas de ordeño donde la higiene es muy deficiente y que al ordeñar, se dejan caer al piso los primeros chorros de leche (Valera, 2005).

En el medio, *Brucella* sobrevive por periodos relativamente largos, teniendo en cuenta que es una bacteria no esporulada. En el suelo húmedo y el estiércol usado como abono, se registran tiempos de sobrevivencia hasta 80 días. En el polvo, según la humedad ambiente, entre 15 y 40 días. Esto hace que *Brucella* pueda diseminarse eficientemente de un medio infectado a uno indemne; los recipientes de leche o agua, las camas, los instrumentos contaminados, los zapatos, perros y aves le sirven de vehículo (Stanchi, 2007).

3.4 Transmisión

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas. Las vacas tienen además la costumbre de lamer membranas fetales, fetos y terneros recién nacidos, que contienen todos ellos gran número de brucelas y constituyen una fuente de

infección muy importante. El instinto de las vacas de lamer los órganos genitales de otras vacas contribuye también a la transmisión de la infección, sin embargo algunos autores consideran que el contagio por vía cutánea tiene por lo menos, la misma importancia, por ejemplo: se pueden producir infecciones mediante las camas infectadas, cuando haya lesiones en las tetillas o en los extremos de los miembros o en el espacio interdigital que faciliten la penetración del agente patógeno en capas profundas de la piel, al ordeñar, quizás puedan introducirse brucelas en la piel de los pezones mediante las manos humedecidas con leche infectada. La vía vaginal fue utilizada por Bang en 1903 y otros para reproducir experimentalmente la infección. Según los experimentos realizados, al parecer se necesitan un gran número de gérmenes (sin precisar cifras) para infectar una vaca por esta vía. Por otra parte, no hay dudas de que la vía intrauterina que se emplea en la inseminación artificial es muy importante en la transmisión de la infección. En ambientes cerrados, es probable que la infección se transmita por aerosoles. La penetración por vía aerógena ha sido demostrada experimentalmente. La infección artificial se consigue a través de la conjuntiva tras la inoculación de brucelas en ese sitio (Valera, 2005, Kahn, 2007).

La infección parece aumentar a medida que se acerca la madurez sexual, y es grande asimismo en los animales que la han alcanzado y no han padecido antes la infección. La sangre de los terneros recién nacidos de vacas infectadas no contienen anticuerpos, aunque estos son ingeridos con la leche calostroal. Los anticuerpos se demuestran en la sangre después de seis meses (Valera, 2005).

Se ha determinado que aproximadamente el 65 % de las vacas infectadas abortan; de éstas, el 65% abortan solo una vez, y el 23%, dos veces. Un porcentaje mucho más pequeño abortan más de dos veces. Cuando el aborto no se presenta y la preñez llega a su término, a menudo la cría está débil y el animal recién nacido sufre neumonía y enteritis, lo cual retrasa seriamente su desarrollo. Se estima que del 40 al 50% de las vacas afectadas tienen obstaculizadas su

capacidad reproductora, como resultado de la enfermedad en leche (Valera, 2005).

3.5 Periodo de incubación

En los bovinos, las pérdidas reproductivas ocurren durante la segunda mitad de la preñez; por consiguiente, el período de incubación es más prolongado cuando los animales se infectan en etapas tempranas de la gestación. En estas especies, los abortos y los mortinatos ocurren entre 2 semanas a 5 meses después de la infección (CFSPH, 2009).

3.6 Patogenia

En los rumiantes, la infección se adquiere sobre todo por vía oral, nasal o conjuntival. Luego de haber atravesado las mucosas (o la piel lesionada) *Brucella* se localiza en los ganglios linfáticos regionales (retrofaringeos, parotídeos y submaxilares entre los más frecuentes) para desde allí diseminarse hacia otros órganos linfoides, como el bazo, los ganglios ilíacos y los retromamarios. El periodo de incubación está relacionado con el estado fisiológico de la hembra. En la hembra no gestante, la infección permanece localizada en los ganglios retromamarios. Durante la gestación, *Brucella* invade el útero en donde se multiplica masivamente. Allí provoca una endometritis con ulceración de los espacios intercotiledonarios y compromiso del alantocorion, de los cotiledones placentarios y de los líquidos fetales. Los fetos desarrollan hiperplasia linfóide, depleción tímica y neumonía hematógena. En el caso de una primoinfección, el proceso culmina de modo característico con el aborto en el último tercio de la gestación. La retención de placenta y la metritis son secuelas frecuentes. El aborto es menos observado en gestaciones subsiguientes, aunque las hembras quedan infectadas, y eliminan brucelas con cada parto. Los neonatos pueden infectarse vía intrauterina, origen de brucelosis “latentes”. En el macho, la enfermedad se

caracteriza por orquitis y/o epididimitis, y a menudo también prostatitis y seminovesiculitis. En ocasiones se producen artritis y sinovitis no supurativas (Stanchi, 2007).

3.7 Signos clínicos

En el ganado bovino, *B. abortus* causa abortos, mortinatos y terneros débiles; los abortos generalmente ocurren durante la segunda mitad del período de gestación. Es posible que la placenta quede retenida y disminuya la lactancia. Después del primer aborto, las preñeces subsiguientes son generalmente normales; sin embargo, las vacas pueden eliminar el organismo en la leche y en las descargas uterinas. En los toros, algunas veces se observa epididimitis, vesiculitis seminal, orquitis y abscesos testiculares. En ocasiones se produce infertilidad en ambos sexos, debido a metritis u orquitis/epididimitis. En algunos países tropicales, un síntoma común es la presencia de higromas, particularmente en las articulaciones de las patas. Se puede manifestar artritis después de infecciones prolongadas. Los signos sistémicos normalmente no aparecen en infecciones no complicadas, y las muertes son raras, salvo en el feto y el recién nacido. En general las hembras con infecciones pero no gestantes no presentan síntomas (Kahn, 2007, CFSPH, 2009).

3.8 Lesiones post mortem

Algunos fetos abortados parecen normales; otros están autolíticos o presentan cantidades variables de edema subcutáneo y líquidos con manchas de sangre en las cavidades del cuerpo. En los fetos de rumiantes, el bazo y/o hígado pueden estar agrandados y los pulmones pueden mostrar neumonía y pleuritis fibrosa. Los abortos provocados por *Brucella spp.* generalmente están acompañados por placentitis, los cotiledones pueden ser rojos, amarillos, normales o necróticos. En el ganado vacuno y en los pequeños rumiantes, la región intercotiledonaria tiene una apariencia típica de cuero, parece húmeda y

tiene un engrosamiento focal. Puede haber exudados sobre la superficie (CFSPH, 2009).

En los animales adultos, pueden encontrarse lesiones granulomatosas a purulentas en el tracto reproductivo del macho y de la hembra, glándula mamaria, ganglios linfáticos supramamarios y otros tejidos linfáticos, huesos, articulaciones y otros órganos y tejidos. Se puede observar endometritis de leve a grave después de un aborto, y los machos pueden tener epididimitis y/o orquitis unilateral o bilateral. En el ganado vacuno infectado con *B. abortus*, pueden encontrarse higromas en las rodillas, rótula, corvejón, ángulo de las ancas y entre el ligamento de la nuca y las vértebras dorsales principales (CFSPH, 2009).

3.9 Tratamiento

En términos generales no se lleva a cabo tratamiento terapéutico en esta enfermedad. Han fracasado en el sentido de eliminar la infección, los ensayos llevados a cabo con plasma bovino, sulfadiacina, estreptomicina y cloro-tetraciclina, administradas por vía parenteral, y las dos últimas en infusiones en la ubre (Kahn, 2007).

3.10 Control y erradicación

La brucelosis bovina puede controlarse con un programa de vacunación eficaz o mediante la erradicación usando un programa de prueba y sacrificio. La vacuna con cepa 19 disminuye acentuadamente la incidencia de abortos, pero no se disminuye con ello el nivel de infección a una tasa correspondiente. Aun con el programa de vacunación amplia habrá focos de infección que se perpetúen indefinidamente. La erradicación total es una de las alternativas de control mediante la vacuna en algunos países que ya se ha alcanzado, y en otros se están llevando a cabo programas de erradicación. Además del problema de la

exposición de los humanos a la infección, deben evaluarse el costo y los beneficios de un programa de control mediante vacunación (Blood, 1982).

Hay ciertas consideraciones básicas que deben tomarse en cuenta en todos los programas encaminados a erradicar la brucelosis. 1.) Los programas de control inherentes a un área determinada deben recibir reconocimiento primario, y todo plan o planes deberán ser adaptados a esa área. 2.) Es necesaria la cooperación absoluta a todos los niveles, tanto a nivel regional como nacional para que el programa tenga éxito. La cooperación se logra únicamente con un programa intensivo de educación. El propietario de un hato infectado debe reconocer el problema de la brucelosis y expresar su voluntad de cooperar. La experiencia revela al propietario con los peligros que entraña la enfermedad para la salud de los humanos y con las pérdidas económicas que pueden ocurrir a causa de los animales infectados. 3.) Debe contarse con un método de diagnóstico uniforme disponible para todo el programa. 4.) Si se descubre la enfermedad en un hato, deberá contarse con procedimientos establecidos para manejar la enfermedad. Si se va a efectuar inmunización, se deberá contar con un agente de inmunización estandarizado y efectivo. La eliminación de los animales infectados puede crear una grave amenaza económica para el propietario y es necesario investigar las posibilidades de indemnización. 5.) Por último, y lo que es más importante, el desplazamiento de animales de una región a otra debe ser controlada a un alto nivel, ya que en un programa rígido de erradicación de una región puede quedar nulificado por la negligencia en que se ocurra en una región vecina (Blood, 1982).

3.11 Diagnóstico

Todos los abortos del ganado bovino en fases tardías de la gestación, a partir del quinto mes, deben tratarse como sospechosos de brucelosis y deben estudiarse. El cuadro clínico no es patognomónico, aunque el historial del rebaño puede servir de ayuda. El diagnóstico inequívoco de una infección por *Brucella sp*

solo puede hacerse mediante su aislamiento y su identificación, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en los métodos serológicos. No existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella* sp. Normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento y métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares (Kahn, 2007, OIE, 2009).

3.11.1 Identificación del agente etiológico

3.11.1.1 Métodos de tinción

El género *Brucella* está formado por cocobacilos o bacilos cortos que miden 0,6–1,5 µm de largo por 0,5– 0,7 µm de ancho. Normalmente aparecen aislados, y con menos frecuencia en pares o en grupos pequeños. La morfología de los microorganismos del género *Brucella* es bastante constante, aunque en cultivos viejos se pueden observar formas pleomórficas. *Brucella* es una bacteria inmóvil. No forma esporas ni flagelos, ni fimbrias ni cápsulas verdaderas, son gramnegativos, no son verdaderamente bacterias ácido-alcohol resistente, pero resisten a la decoloración por ácidos débiles y se tiñen de rojo mediante el método de Ziehl–Neelsen modificado por Stamp. Este método constituye el procedimiento normal para el examen de frotis de órganos o de líquidos biológicos fijados previamente con calor o con etanol y por este método *Brucella* se tiñe de rojo sobre un fondo azul. También puede utilizarse una técnica basada en anticuerpos conjugados a un fluorocromo o marcados con peroxidasa. La presencia de microorganismos intracelulares con la morfología descrita, débilmente resistentes a ácidos, o inmunoespecíficamente teñidos, constituye un indicio preliminar de brucelosis. Sin embargo, estos métodos presentan una baja sensibilidad en la leche y en productos lácteos, donde las brucelas se presentan a menudo en escaso número, y donde la presencia de glóbulos de grasa a menudo impide una interpretación correcta. En la interpretación de los resultados positivos por el

método de Stamp hay que proceder con prudencia, puesto que otros microorganismos que también causan aborto, como *Chlamydophila abortus* (antes *Chlamydia psittaci*) o *Coxiella burnetii* son difíciles de diferenciar de brucela. Los resultados, tanto positivos como negativos, deben confirmarse por cultivo (OIE, 2009).

3.11.1.2 Cultivo

3.11.1.2.1 Medios de cultivo bacteriológico

El aislamiento y cultivo directo de brucela se realizan normalmente en un medio sólido. En general, este representa el método más satisfactorio porque permite aislar y reconocer claramente las colonias que se desarrollan. Los medios sólidos también limitan el establecimiento de los mutantes no lisos y el desarrollo excesivo de contaminantes. Sin embargo, para muestras voluminosas o con fines de enriquecimiento puede recomendarse el empleo de medios líquidos. Existe una gran variedad de medios basales deshidratados a nivel comercial, como la base de medio para brucela, o el agar triptosa (o *tripticase*)-soja (TSA). Es necesario añadir un 2–5% de suero bovino o equino para el cultivo de algunas cepas, como la biovariedad 2 de *B. abortus*, y muchos laboratorios lo añaden sistemáticamente al medio basal con resultados excelentes, como en el caso del agar sangre (Oxoid) o agar Columbia (*BioMérieux*). También pueden utilizarse otros medios satisfactorios, como el agar de suero-dextrosa (SDA) o el agar de glicerol dextrosa. El medio SDA es normalmente el de elección para la observación de la morfología de las colonias. Para el aislamiento de *Brucella* de la sangre o de la leche, y de otros líquidos del cuerpo, donde se aconseja un cultivo de enriquecimiento, se recomienda un medio bifásico no selectivo conocido como medio de Castañeda. Este medio se emplea porque las brucelas tienden a disociarse en medio líquido y esto interfiere con la biotipificación llevada a cabo mediante las técnicas bacteriológicas convencionales (OIE, 2009).

3.11.1.3 Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluido el formato en tiempo real, constituye otro medio de detección e identificación de *Brucella sp.*. Pese al alto grado de homología del ácido desoxirribonucleico (ADN) dentro del género brucela, se han desarrollado varios métodos moleculares que permiten, hasta cierto punto, la diferenciación entre especies de brucela y algunas de sus biovariedades, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) ampliados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transferencia *Southern*. Se ha desarrollado también una electroforesis en gel de campo pulsante que permite la diferenciación entre varias especies de brucela. Mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede biotipificarse brucela y pueden diferenciarse las cepas vacunales, pero la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha validado poco para el diagnóstico primario (OIE, 2009).

3.11.2 Pruebas serológicas

No existe ninguna prueba serológica que sea adecuada en todas las situaciones epidemiológicas; todas tienen limitaciones, sobre todo cuando se trata de detectar la enfermedad en animales aislados. Se deben tener en cuenta todos los factores que influyen en la relevancia del método analítico y en los resultados de la prueba para una interpretación o aplicación diagnóstica concreta. En unidades epidemiológicas en las que se practique la vacunación con *Brucella lisa*, pueden esperarse falsos positivos en animales vacunados, porque los anticuerpos presentan reacción cruzada con la infección por la cepa natural. Los métodos serológicos que se describen en este capítulo son métodos estandarizados y validados, con características de realización adecuadas para ser consideradas pruebas obligadas o alternativas para el comercio internacional. Esto no impide el uso de pruebas modificadas o similares ni la utilización de reactivos biológicos

diferentes. Sin embargo, los métodos y reactivos descritos en este capítulo suponen un estándar de comparación en cuanto al rendimiento diagnóstico esperado (Rebhun, 1995; OIE, 2009).

Debe resaltarse que la prueba de la Seroaglutinación en Tubo (SAT) se considera en general inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de la Fijación del Complemento (FC) es más específica que la prueba de la seroaglutinación en tubo (SAT) para el diagnóstico, y además posee un sistema estandarizado de unidades. Las características de rendimiento diagnóstico de algunos ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y la prueba de la Polarización de Fluorescencia (FPA) son similares o superiores a la Fijación del Complemento (CF) y, como son técnicamente más fáciles de realizar y más robustas, pueden ser preferibles a otras. Se ha comparado el rendimiento de varias de estas pruebas (Rebhun, 1995; OIE, 2009).

Para el control de la brucelosis en un país o región, son adecuadas para el análisis las pruebas con antígeno tamponado de brucela, es decir, la prueba con Rosa de Bengala (RBT) y la prueba de Aglutinación Tamponada en Placa (BPAT), así como el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y la prueba de la Polarización de Fluorescencia (FPA). Las reacciones positivas deben volverse a comprobar utilizando una estrategia confirmativa adecuada y/o complementaria (OIE, 2009).

En otros huéspedes, como por ejemplo en búfalos (*Bubalus bubalus*), bisonte americano y europeo (*Bison bison*, *Bison bonasus*), yak (*Bos grunniens*), elk/wapiti (*Cervus elaphus*) y camellos (*Camelus bactrianus* y *C. dromedarius*), y camélidos sudamericanos, la infección por *Brucella* sp. sigue un curso similar que en el ganado bovino. Para estos animales pueden utilizarse los mismos procedimientos serológicos, pero cada uno debe ser validado para la especie de animal estudiada (Rebhun, 1995; OIE, 2009).

La presencia de hemólisis en las muestras de suero interfiere en la eficiencia de la prueba de aglutinación, no solo porque la coloración turbia puede enmascarar la reacción de aglutinación, sino porque se forma un precipitado como resultado de la acción del fenol que contiene el antígeno sobre la hemoglobina libre. Es muy difícil distinguir esta falsa precipitación de la aglutinación específica del antígeno (SENACSA, 2001).

3.11.2.1 Prueba de tarjeta o rosa de Bengala

Consiste en confrontar el suero problema con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración de 8% para el diagnóstico en bovinos y de 3% en caprinos. Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de IgG e IgM de origen vacunal o debidos a infecciones naturales. Esta prueba es sencilla, económica y práctica, por lo que se puede realizar en todo el hato. Sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* y *Pseudomonas* (Morera, 2005).

Esta prueba tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100% (Morera, 2005).

3.11.2.2 Prueba de Rivanol

Esta prueba diagnóstica tiene el mismo principio de la prueba de tarjeta, sólo que se le adiciona una sustancia (lactato) Rivanol para que precipite los anticuerpos IgM y el sobrenadante de esto contendrá los anticuerpos IgG que serán aglutinados con los antígenos en la prueba, reaccionando sólo aquellos sueros con anticuerpos de infección. Pero como la vacunación en un animal utilizando cepa 19 genera al principio anticuerpos de los dos tipos y los IgG perduran aproximadamente 12 a 18 meses, este animal estará dando reacciones

positivas por este periodo en la prueba de tarjeta y a Rivanol, pero según el título de anticuerpos y la fecha de muestreo con fecha de vacunación se dará el dictamen. Es aquí donde la prueba de Rivanol es importante para detectar animales con anticuerpos de vacunación y no de infección. Cabe mencionar que esto ocurre sólo si el animal fue vacunado con la cepa 19, pero si un animal fue vacunado con RB51 la prueba de Rivanol no diferenciará estos anticuerpos por no tener especificidad contra esta cepa y sólo detectará animales con infección al igual que tarjeta (Adams, 2007).

Esta prueba posee una sensibilidad que varía de 86 a 97%, por lo tanto, no se recomienda en etapas finales de programas de erradicación; sin embargo su alta especificidad (100%) la hace útil como prueba confirmatoria en programas de control (Dájer-Abimerhi, 2003).

3.11.2.3 Prueba de fijación de complemento

La Fijación de Complemento (FC), prueba prescrita para el comercio internacional, está ampliamente aplicada y aceptada como prueba confirmativa pese a la complejidad de su ejecución y a la necesidad de unas buenas instalaciones y de personal formado para titular y mantener los reactivos adecuadamente. Existen muchas variaciones de la Fijación de Complemento, pero esta prueba se suele realizar de forma más cómoda en formato de micro titulación. Para la incubación de suero, antígeno y complemento, se puede utilizar la fijación en caliente o en frío: 37 °C durante 30 minutos o 4 °C durante 14 – 18 horas. Varios factores influyen en la elección del método: la actividad anti complementaria de muestras de suero de baja calidad es más evidente con la fijación en frío, mientras que a 37 °C aumenta la frecuencia e intensidad de las pro zonas, y se deben probar varias diluciones para cada muestra (OIE,2009).

Se han propuesto varios métodos para la Fijación de Complemento en los que se utilizan diferentes concentraciones de eritrocitos de oveja (SRBC) frescos o conservados (normalmente se recomienda una suspensión al 2, 2,5 o 3%). Los eritrocitos de oveja están sensibilizados con un volumen igual de suero de conejo anti-SRBC diluido hasta contener varias veces (en general de dos a cinco) la concentración mínima necesaria para producir un 100% de lisis de eritrocitos de oveja en presencia de una solución titulada de complemento de cobaya. El último se titula independientemente (en presencia o ausencia de antígeno, según el método) para determinar la cantidad e complemento necesaria para producir el 50% o el 100% de lisis de los eritrocitos de oveja sensibilizados por unidad de volumen de una suspensión estándar; estas se definen como la unidad hemolítica de complemento al 50% o al 100%/ dosis hemolítica mínima (C'H o MHD50 o C'H o MHD100), respectivamente. Se suele recomendar titular el complemento antes de cada serie de pruebas, siendo preferible un micrométodo para la determinación óptima de C'H50. Normalmente se utilizan en la prueba 1,25 – 2 C'H100 o 5–6 C'H50 (OIE, 2009).

El diluyente estándar para la Fijación de Complemento es una solución salina tamponada con barbitol (veronal). Se prepara con comprimidos comerciales; como alternativa, se puede preparar a partir de una solución madre de cloruro sódico (42,5 g), ácido barbitúrico (2,875 g), dietil barbiturato sódico (1,875 g), sulfato magnésico (1,018 g) y cloruro cálcico (0,147 g) en 1 litro de agua destilada, y se diluye antes de utilizarla añadiendo cuatro volúmenes de una solución de gelatina al 0,04% (OIE, 2009).

Esta prueba tiene una sensibilidad del 97.5% y una especificidad de 99.9% (Morera, 2005).

3.11.2.4 Prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA)

Es una prueba rápida por la que un anticuerpo o antígeno se une a una enzima como medio para detectar una relación entre el anticuerpo y el antígeno (Andrade, 2001).

Es una prueba que desde el punto de vista de sensibilidad, ha demostrado que durante la fase aguda de la infección existe una respuesta de anticuerpos clásicos: aumento de IgM e IgG, que va descendiendo (Andrade, 2001).

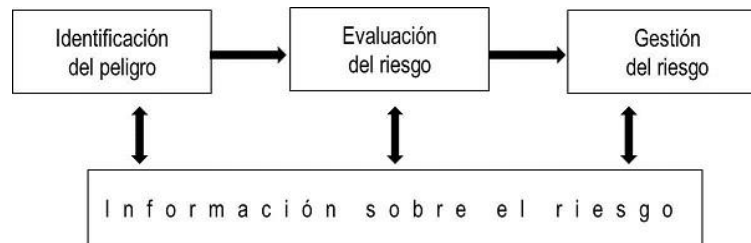
3.12 Análisis de riesgo

Las importaciones de animales o productos de origen animal implican cierto riesgo de enfermedad para el país importador. Ese riesgo pueden constituirlo una o varias enfermedades o infecciones (OIE, 2014).

La principal finalidad del análisis del riesgo asociado a las importaciones es proporcionar a los países importadores un método objetivo y justificable para evaluar los riesgos de enfermedad asociados a cualquier importación de animales, productos de origen animal, material genético animal, alimentos para animales, productos biológicos y material patológico. El análisis deberá ser transparente para poder dar al país exportador una explicación clara y documentada de los motivos que justifican las condiciones impuestas a la importación o el rechazo de ésta.

Las etapas del análisis de riesgos son la identificación del peligro, la evaluación del riesgo, la gestión del riesgo y la información sobre el riesgo (OIE, 2014).

Figura No. 1 Etapas del análisis de riesgos



Fuente: Pfeiffer, 1999

3.12.1 Algunas de las consideraciones para mantener su hato libre de la brucelosis son:

- Mantenga su hato cerrado y críe sus propios reemplazos. Las becerras nacidas de hembras infectadas son altamente peligrosas porque dispersan la brucelosis en los hatos, ya que hasta el 20% de ellas están infectadas persistentemente y al parir transmiten la infección al ganado susceptible.
- Se debe comprar sólo vaquillas vacunadas o con pruebas negativas de hatos que tengan su certificado de hato libre de brucelosis. Nunca compre animales de hatos con antecedentes sanitarios dudosos.
- Es necesario aislar y volver a probar todo el hato de reemplazo a los 60 - 120 días después de la compra. Es necesario planificar las compras para no tener que comprar en épocas de empadre.
- Hay que mejorar las prácticas de manejo en el rancho, aunque no es una garantía de que la enfermedad no entre a los ranchos por medio de perros o predadores que arrastren fetos contaminando los pastizales, mantener los lienzo en buen estado, evita que animales mayores pasen, mezclen y contaminen directamente a animales y potreros. En los potreros que limiten

con otras explotaciones hay que tener sólo ganado vacunado o bien castrado. Hay que separar a las vacas que paran, y limpiar y eliminar a los fetos abortados y crías que mueran después de nacer, quemándolos o enterrándolos.

- Hay que mantener el ganado en observación constante e investigar cualquier signo de enfermedad. Es necesario aislar y probar cualquier animal si se sospecha de brucelosis.
- Obtenga su certificado de hato libre de brucelosis, para evitar restricciones de movilización, y además es más fácil comercializar animales que están libres de la enfermedad.
- La brucelosis es una enfermedad que por su difusión afecta a hatos vecinos, el probar y volver a probar es la única forma de saber que un hato no se ha infectado. La falla de algún hato vecino en probar puede resultar en la diseminación continua de la infección.
- Obtenga consejos de un veterinario aprobado para todas las cuestiones de salud y obtenga la asistencia de un veterinario inmediatamente si una vaca aborta o pare antes de tiempo.
- Manténgase informado sobre los avances de la campaña en su región y los diferentes ordenamientos del programa (Pfeiffer, 1999).

3.13 Medidas de concordancia para variables cualitativas – *Kappa*

Se trata de medir el grado de acuerdo entre varios métodos o evaluadores que clasifican al paciente (o el resultado de una observación) según una serie de posibilidades (categorías) mutuamente excluyentes. El caso más sencillo se

presenta cuando la variable cualitativa es dicotómica (dos posibilidades) y se está comparando dos métodos de clasificación (por ejemplo dos escalas clínicas). Esta situación se puede representar en un cuadro de frecuencias:

Cuadro No. 1 Medidas de concordancia para variables cualitativas-Kappa-

		Método B		
		Positivo	Negativo	
Método A	Positivo	a	c	f1
	Negativo	b	d	f2
		c1	c2	n

Fuente: (Molinero, 2001)

La medida más simple de concordancia es la proporción de coincidencias frente al total de sujetos, $(a + d) / n$ (Molinero, 2001).

Pero resulta que aunque no existiera ninguna relación entre los dos métodos de clasificación, está claro que es previsible que encontremos algún grado de concordancia entre ellos por puro azar. Así, si el método A consiste en clasificar al paciente con resultado positivo si sale cara al lanzar una moneda al aire y cruz en el caso contrario, y hacemos lo mismo en el método B (con otra moneda diferente), es previsible encontrar en promedio del orden de un 50 % de coincidencias (Molinero, 2001).

Supongamos que el sistema A es un método científico de diagnóstico y el método B es la opinión de un "vidente"; también ahora es previsible encontrar un cierto grado de concordancia debido en parte al azar (Molinero, 2001).

Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar, se define el índice de concordancia kappa de la siguiente manera:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

donde P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1, por lo que $1 - P_e$ representa el margen de acuerdo posible no atribuible al azar. De ese margen nosotros observamos probablemente sólo una parte $P_o - P_e$, salvo que haya acuerdo perfecto $P_o = 1$ (Molinero, 2001).

Así pues en caso de concordancia perfecta el valor de kappa es 1; si la concordancia observada es igual a la esperada kappa vale 0; y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado el índice kappa es menor que cero (Molinero, 2001).

Para calcular P_e , la concordancia esperada, el razonamiento es el siguiente: de acuerdo con la tabla anterior la probabilidad de que el método A clasifique a un sujeto como positivo podemos estimarla como f_1/n ; mientras que la correspondiente probabilidad del método B la estimaremos como c_1/n . Si consideramos que existe independencia entre ambos métodos de clasificación, la probabilidad de que coincidan clasificando al mismo sujeto como positivo será entonces el producto de las dos probabilidades (sucesos independientes) (Molinero, 2001).

Aplicando el mismo razonamiento calculamos la probabilidad de que se produzca acuerdo entre los métodos al clasificar a un sujeto como negativo, y entonces la probabilidad de acuerdo cualquiera de las dos clasificaciones será la suma de ambos valores, esto es:

$$P_e = \frac{f_1 \cdot c_1 + f_2 \cdot c_2}{n^2}$$

El coeficiente kappa fue propuesto originalmente por Cohen (1960) para el caso de dos evaluadores o dos métodos, por lo que a menudo se le conoce como kappa de Cohen, y fue generalizado para el caso de más de dos evaluadores por Fleiss, por lo que a veces también se habla del índice kappa de Fleiss (Molinero, 2001).

Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa:

Cuadro No. 2 Márgenes para valorar el grado del índice Kappa

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	insignificante
0,2 - 0,4	bajo
0,4 - 0,6	moderado
0,6 - 0,8	bueno
0,8 - 1	muy bueno

Fuente: Molinero, 2001

Este índice se puede generalizar para clasificaciones multinomiales (más de dos categorías) y para más de dos evaluadores, siendo similar su interpretación (Molinero, 2001).

En el caso de más de dos categorías, además del índice de concordancia global puede ser interesante determinar el grado de concordancia específico en alguna de las categorías (o en todas), lo que equivale a convertir el resultado posible en dos únicas respuestas: se clasifica al paciente en la categoría de interés o se clasifica en alguna de las restantes. De esta manera para cada una de las categorías vamos convirtiendo la tabla original en tablas 2x2 y podemos entonces calcular el valor del correspondiente índice kappa como si de una variable dicotómica se tratara (Molinero, 2001).

La gran utilización del índice de concordancia kappa en la literatura médica se debe probablemente tanto a la facilidad de cálculo, como a su clara interpretación. El principal problema de esta medida de concordancia radica en que está pensada para clasificaciones nominales, en las que no existe un orden de graduación entre las diferentes categorías. Cuando esto no es así, pensemos por ejemplo en una clasificación del tipo Muy grave - grave - leve - sin importancia, donde no es lo mismo que el desacuerdo se produzca clasificando como sin importancia por un evaluador y leve por otro, a que uno de ellos clasifique como sin importancia y otro como muy grave. El índice kappa hasta ahora descrito únicamente tiene en consideración si hay o no acuerdo, esto es si se clasifica o no al sujeto en la misma categoría, por lo que a la hora de calcularlo pesan por igual las dos situaciones anteriormente descritas (Molinero, 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y equipo

- 1 computadora
- 1 impresora
- 1 fotocopidora
- 150 fichas de datos de campo
- 150 fichas de datos para laboratorios
- 20,000 aretes oficiales (1 par por bovino)
- 10 aplicadores de aretes
- 2 vehículos (movilizar personas de brigada)
- 1 vehículo + 1 tráiler (movilizar caballos)
- 720 galones combustible
- 2 centrifugas (capacidad de 36 tubos vacutainers cada uno)
- 20,000 tubos vacutainers (7ml)
- 20,000 crioviales (2ml)
- 20, 000 agujas vacutainer
- 12 porta vacutainer
- 250 cajas para los crioviales
- 6 marcadoras permanentes
- 10 hieleras para enviar muestras al laboratorio
- 100 congelantes
- 12 overoles
- 10 pares de botas de hule
- 2 mesas con silla (1 por brigada)
- 2 carpas (1 por brigada)
- 2 GPS
- 4 Cubetas
- 12 Galones de desinfectantes

- 1 Caja papel mayordomo
- Pruebas de tarjeta – Aba Test Tarjeta al 8%, Antígeno *Brucella abortus*, cepa 1119-3, inactivado.
- Pruebas de Rivanol – Aba Test Rivanol al 1%, Antígeno *Brucella abortus*, cepa 1119-3, inactivado.
- *Brucella* control positivo
- Aglutinoscopio
- Micropipeta 5 - 50 uL, 40 – 200 uL
- Tips 5 - 200 uL
- Agitadores
- Palillos
- Reloj

4.1.1 Personal

- 2 veterinarios (1por brigada)
- 2 areteadores (1por brigada)
- 2 colectores de data (1 por brigada)
- 6 vaqueros (3 por brigada)
- 1 persona para base de datos
- 2 técnicos de laboratorio
- 3 personas en punto de control de movimiento animal

4.1.2 Infraestructura

- 1 oficina (ser identificado por productores)
- 1 laboratorio temporal
- Laboratorio de Autoridad Agropecuaria de Salud Animal de Belice (BAHA)
- 1 casita en puesto de control de movimiento

4.2 Metodología

Se formaron dos brigadas para realizar la toma de muestras. Cada brigada estuvo constituida de un veterinario acreditado, un areteador, un colector de información, dos sujetadores que manejarán la prensa y tres vaqueros. En el momento de muestrear se identificaron cada bovino con los aretes oficiales de Belice de acuerdo con la legislación de identificación animal, regulación no. 77 de 2011, además se hizo la prueba de tuberculosis bovina.

Las brigadas informaron a todos los productores sobre las fechas en que se llevaron a cabo las visitas para que tuviesen a los animales confinados en sus respectivos corrales. Los productores que no contaban con presa en sus corrales acudieron al corral más cercano que si contara con dichas facilidades. Los trabajadores de las fincas brindaron ayuda con el manejo de los animales durante la realización del muestreo.

La muestra de sangre se tomó de la parte ventral de la base de la cola por el veterinario acreditado utilizando aguja y tubo *vacutainer*. Después fue identificado con un número consecutivo utilizando marcador permanente, iniciando con el número uno en cada finca donde el número de la muestra tuvo una relación al número del arete en la ficha de control de campo. También se dio un código a la finca lo cual fue registrado en la ficha de control. Las muestras se mantuvieron en las hieleras durante su estancia en el campo. Se transportaron las muestras del campo hacia el espacio identificado como laboratorio temporal donde se centrifugaron y almacenaron. Las muestras hemolizadas fueron tomadas nuevamente. Se almacenaron en crioviales los cuales fueron congelados. Todo bovino fue muestreado mayores de 6 meses de edad.

Se estableció un puesto de control de movimiento animal en la entrada a la comunidad de *Blue Creek* para regular el movimiento de los bovinos. Se permitió

el movimiento solo si el transportista presenta un permiso emitido por la Autoridad Agropecuaria de Salud Animal de Belice (BAHA). Se contrataron 3 personas para el puesto de control con una rotación de 12 horas.

El trabajo específico en este estudio fue de laboratorista, recibiendo, preparando y realizando las diferentes pruebas de serología.

4.2.1 Tomas de muestras

Todas las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Autoridad Agropecuaria de Salud Animal de Belice (BAHA) lo cual se ubica 180 km de la comunidad de *Blue Creek*. Se realizó la Prueba de Tarjeta como tamizaje y a los reactores positivos a esta prueba se le hizo una Prueba de Rivanol. Los reactores positivos a la prueba de Rivanol se enviaron al Laboratorio Regional Central de Mérida Yucatán, México donde se realizó la prueba de Fijación de Complemento como prueba confirmativa.

4.2.1.1 Procedimiento de Card test

- El suero y el antígeno estuvieron a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$).
- Se depositó 30 uL de suero problema sobre cada cuadrante de la placa de aglutinación.
- Se depositó 30 uL del antígeno cerca al suero problema.
- Se mezcló el suero y el antígeno donde formaron una zona circular de aproximadamente 2cm de diámetro.
- Se marco el timer por 5 minutos.
- Se colocó la placa de aglutinación sobre el agitador donde se realizaron movimientos rotatorios (10-12 por minuto).
- Transcurrido el tiempo, se procedió a la lectura sobre el aglutinoscopio.

- Las reacciones positivas presentaron grumos de aglutinación y las negativas tuvieron ausencia de éstos (Morera, 2005).

4.2.1.2 Procedimiento de Rivanol

- El suero problema, el antígeno y la solución de Rivanol estuvieron a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba.
- Se depositó 200 uL del suero problema en un tubo pequeño (13 x 100mm) y después se agregó 200 uL de solución Rivanol, agitando bien el tubo y dejando a temperatura ambiente no menos de 5 minutos y no más de 1 hora.
- Se procedió a centrifugar las mezclas, aproximadamente a 2000 rpm, durante 5 minutos.
- Con micropipeta, se aspiró el líquido sobrenadante. En la placa de aglutinación se depositaron cantidades de 80 µL (1:25), 40 µL (1:50), 20 uL (1:100), 10 µL (1:200), y 5 (1:400) µL.
- Se agregó 30 µL de antígeno Rivanol a cada cantidad de líquido sobrenadante donde se mezcló con un palillo comenzando con la de menor cantidad en este caso 5 µL.
- La placa se inclinó realizando movimientos circulares 4 veces.
- El reloj se programó para que suene a los 12 minutos.
- Transcurridos 6 minutos, la placa se giro 4 veces.
- A los 12 minutos la placa se giro 4 veces nuevamente.
- Se procedió a la lectura sobre el aglutinoscopio.
- El resultado se expreso en función de la dilución más alta en la que se observo la aglutinación (Ya, 2012).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro No. 3 Resultados obtenidos con las diferentes pruebas utilizadas

	Prueba de Tarjeta (+)	Rivanol (+)	Fijación de complemento (+)
Global:	104	16	0
Por Area:			
La Rosita	6	1	0
Reinland	17	1	0
Edenthal	17	1	0
Northern Community	20	9	0
Blue Creek	6	0	0
Neuendorf North	1	0	0
Blumenthal	10	1	0
Schoenberg	1	0	0
Pine Ridge	8	2	0
Gallon Jug	4	0	0
Cool Shade	11	1	0
West Lowlands	2	0	0
Blumenort	1	0	0
Total	104	16	0

Fuente: Elaboración propia

De las muestras analizadas, 104 positivas a la Prueba de Tarjeta siendo la mayoría procedentes de Northern Community donde resultaron 20 muestras positivas. De estas 104 muestras, se les realizó la Prueba de Rivanol donde 16 resultaron positivas a esta prueba. Por último, se realizó a las 16 muestras la Prueba de Fijación de Complemento las cuales todos resultaron negativos.

Cuadro No. 4 Resumen de resultados

Prueba	+	-
Tarjeta	104	14502
Rivanol	16	14590
Complemento	0	14606

Fuente: Elaboración propia

Cuadro No. 5 Prueba de Kappa

	Kappa
Entre Tarjeta y Fijación de Complemento:	0.9
Entre Tarjeta y Rivanol:	1
Entre Rivanol y Fijación de Complemento:	0.95

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos con la prueba de Kappa (cuadro No. 5) caen entre el margen de 0.8 a 1, lo cual indica que si hay un grado de acuerdo muy bueno entre las pruebas utilizadas.

Cuadro No. 6 Asociación entre la prevalencia y sexo

	Tarjeta	Rivanol	Complemento
Sexo	+	+	+
Macho	7	0	0
Hembra	97	16	0
	104	16	0

Fuente: Elaboración propia

No se encontró asociación estadística significativa ($P > 0.89$) entre el sexo de los animales y el resultado de las pruebas.

Cuadro No.7 Asociación entre la prevalencia edad

	Tarjeta	Rivanol	Complemento
Edad	+	+	+
6 - 15 meses	6	1	0
16 meses o más	98	15	0
	104	16	0

Fuente: Elaboración propia

No se encontró diferencia significativa ($P > 0.94$) entre la variable edad y el resultado de las Pruebas de Tarjeta, Rivanol y Fijación de Complemento.

No se realizó la comparación entre el resultado de la prueba y la raza porque todos fueron *Bos indicus*.

En la zona de Blue Creek, Orange Walk, Belice existen 19,149 cabezas de ganado, de las cuales se analizaron las muestras de 14,606 animales mayores a 6 meses de edad.

Se realizó la Prueba de la Tarjeta al 100% de las muestras obtenidas, dando como resultado 104 muestras sugerentes a positividad ubicadas en 13 comunidades de esa región (cuadro 1), representando esto una prevalencia de 0.71 %. A estos 104 animales se les realizó la Prueba de Rivanol, a lo que 16 muestras fueron positivas, siendo el 15.38% (cuadro 3). Estas 16 muestras positivas se enviaron a México al Laboratorio Regional Central de Mérida, Yucatán, México donde se realizó la Prueba de Fijación de Complemento, las cuales el 100 % tuvieron un resultado negativo indicando que la prevalencia real fue de 0%.

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos en la Prueba de la Tarjeta, esto podría ser por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia sp.*, *Pseudomonas* o por la presencia de anticuerpos vacunales de ganado importado por vía contrabando, ya que en la región del presente estudio no se vacuna contra brucelosis, y esta prueba detecta la presencia de anticuerpos circulantes de IgG e IgM de origen vacunal (OIE, 2009).

Aparte, la Prueba de la Tarjeta posee especificidad del 100% pero una sensibilidad del 94% lo cual podría ser otra razón válida de los falsos positivos (Morera, 2005), sin embargo en el presente estudio se observó una sensibilidad del 99.29% equivalente a 104 muestras positivas de 14,606.

La Prueba de Rivanol resultó con 16 muestras positivas, lo que significa que detectó la presencia de anticuerpos IgG, posteriormente a esta se les realizó la prueba confirmatoria Fijación de Complemento para *Brucella abortus*, obteniendo un resultado de 16 muestras negativas. Los falsos positivos en dicha prueba pudo

ser la causa de anticuerpos vacunales, debido a que la vacuna *Brucella abortus* C19 al inicio genera anticuerpos de los dos tipos IgM e IgG, y los IgG se mantienen aproximadamente de 12 a 18 meses, lo cual hace que se estén dando reacciones positivas por este periodo (Adams, 2009). Otra razón podría ser debido a que la Prueba de Rivanol posee una sensibilidad que varía de 86 a 97%, por lo tanto no se recomienda en etapas finales en programas de erradicación. Sin embargo, por la alta especificidad que posee la prueba, la hace útil como prueba confirmatoria en programas de control (Dájer-Abimerhi, 2003). En el presente estudio se observó una sensibilidad del 85% con la Prueba de Rivanol ya que 16 muestras resultaron positivas.

La Prueba de Fijación de Complemento posee una sensibilidad del 97.5% y una especificidad del 99.9% lo cual está ampliamente aceptada como prueba confirmatoria para el Comercio Internacional (Morera, 2005).

La prueba estadística de *Kappa* fue utilizada para establecer la concordancia entre los resultados de las tres pruebas utilizadas (cuadro 5). La concordancia entre la Prueba de la Tarjeta y la Prueba de Rivanol fue de 1. Entre la Prueba de la Tarjeta y la Prueba Fijación de Complemento fue de 0.9. Por último, entre la Prueba de Rivanol y la Prueba Fijación de Complemento fue de 0.95. Debido a que los resultados caen dentro del parámetro establecido en dicha prueba de 0.8 a 1, esto nos indica que sí hay un acuerdo muy bueno entre las pruebas utilizadas (Molinero, 2001).

Se utilizó la prueba de *Chi* cuadrado la cual determinó posibles asociaciones entre la procedencia, raza, y edad, no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.37$) entre la procedencia y los resultados de la Prueba de la Tarjeta donde fueron de 104 positivos en 13 comunidades (cuadro 3) las cuales, 7 muestras eran de machos y 97 muestras eran hembras, lo cual tampoco se encontró asociación estadística significativa ($P > 0.89$) entre el sexo de los

animales y el resultado de las pruebas (cuadro 6). Con respecto a la edad, se dividieron en dos grupos, 6 a 15 meses y 16 meses o más, donde no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.94$) entre la variable de edad y el resultado de las pruebas, Prueba de tarjeta, Prueba de Rivanol y Prueba de complemento (cuadro: 7). No se realizó la comparación entre el resultado de las 3 pruebas y la raza, debido a que todos fueron *Bos indicus*.

VI. CONCLUSIONES

- La prevalencia de Brucelosis Bovina en la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice es de 0%, confirmado con la Prueba de Fijación de Complemento.
- La concordancia entre los resultados de las tres pruebas utilizadas caen entre el margen de 0.8 a 1 lo cual nos indica que hay un grado de acuerdo muy bueno.
- No se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.37$) entre la procedencia y los resultados de la Prueba de Tarjeta.
- No se encontró asociación estadística significativa ($P > 0.89$) entre el sexo de los animales y el resultado de las pruebas.
- No se encontró diferencia significativa ($P > 0.94$) entre la variable de edad y el resultado de las pruebas de Tarjeta, Rivanol y Fijación de Complemento.
- Los resultados falsos positivos a la Prueba de la Tarjeta pudieron ser por la sensibilidad de la prueba, por reacciones cruzadas con bacterias, o por la presencia de anticuerpos vacúnales.
- Los resultados falsos positivos a la Prueba de Rivanol pudieron ser por la sensibilidad de la prueba o por anticuerpos generados por una vacunación más cercana de 18 meses.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar planes de monitoreo a los animales que dieron positivos a la Prueba de la Tarjeta para verificar si la inmunidad es debido a una vacunación.
- Verificar que los animales que resultaron positivos a la Prueba de la Tarjeta presentan sintomatología de enfermedad o no.
- Realizar planes de monitoreo a los animales que dieron positivos a la Prueba de Rivanol para verificar si la inmunidad se debe a una vacunación más reciente a los 18 meses.
- Establecer programas de educación sanitaria a todos los sectores.
- Fortalecer la participación y la comunicación con productores, trabajadores y veterinarios en las campañas sanitarias.
- Establecer mecanismos que faciliten y garanticen el suministro continuo de reactivos de diagnóstico estandarizados.
- Disponer de recursos financieros que permitan la continuidad de las acciones programadas.
- No trabajar con muestras hemolizadas debido a que puede resultar en falsos positivos.

VIII. RESUMEN

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa, producida por la bacteria *Brucella abortus*, que afecta principalmente a las hembras bovinas en edad reproductiva, provocando abortos. Los machos enteros también pueden infectarse y en ellos la enfermedad se manifiesta con pérdida de la fertilidad debido a orquitis y epididimitis. Además, esta patología es una zoonosis y causa una enfermedad invalidante si no es tratada.

El objetivo del presente estudio fue generar información acerca de la prevalencia de brucelosis en hatos bovinos de la región de Blue Creek, Orange Walk, Belice ya que no existían estudios de la situación de Brucelosis bovina.

El trabajo específico en este estudio fue de laboratorista, recibiendo, preparando y realizando las diferentes pruebas de serología. Todas las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Autoridad Agropecuaria de Salud Animal de Belice (BAHA). Se realizó la Prueba de la Tarjeta como tamizaje y a los reactores positivos a esta prueba se le hizo una Prueba de Rivanol. Los reactores positivos a la Prueba de Rivanol se mandaron al Laboratorio Regional Central de Mérida, Yucatán, México donde se realizó la Prueba de Fijación de Complemento como la prueba confirmativa.

Se realizó la Prueba de la Tarjeta al 100% de las muestras obtenidas, dando como resultado 104 muestras sugerentes a positividad ubicadas en 13 comunidades de esa región, representando esto una prevalencia de 0.71 %. A estos 104 animales se les realizó la Prueba de Rivanol, a lo que 16 muestras fueron positivas ,15.38%. Estas 16 muestras positivas se enviaron a México al Laboratorio Regional Central de Mérida, Yucatán, México donde se realizó la Prueba de Fijación de Complemento, las cuales el 100 % tuvieron un resultado negativo indicando que la prevalencia real fue de 0%.

SUMMARY

Bovine brucellosis is an infectious disease caused by the bacterium *Brucella abortus*, which mainly affects bovine females of reproductive age, causing abortions. The bulls can also become infected which in them the disease manifests loss of fertility due to orchitis and epididymitis. In addition, this disease is a zoonosis and causes a debilitating disease if not treated.

The aim of this study was to generate information about the prevalence of brucellosis in herds of cattle in the region of Blue Creek, Orange Walk, Belize since no previous studies of this situation existed.

The specific work in this study was laboratory technician receiving, preparing samples and performing the different serological tests. All samples were taken to the Laboratory of the Belize Agricultural Health Authority (BAHA). Card Test was performed and the reactors to this test were then performed a Rivanol Test. The samples that were tested positive for the Rivanol Test, were then sent to the Central Regional Laboratory of Merida, Yucatan, Mexico where the Complement Fixation test was performed which is the confirmatory test.

Card Test was performed on 14,606 samples, resulting in 104 samples positive to this test, representing a prevalence of 0.71%. Of these 104 animals, 16 tested positive for the Rivanol Test, representing a prevalence of 15.38%. The 16 samples were then sent to Mexico where Complement Fixation Test was performed, which 100% had a negative result indicating that the actual prevalence is 0%.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, L. (2007). *Brucelosis bovina: control, prevención y perspectivas en Tamaulipas*. Recuperado de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliF001.htm>.
2. Andrade, M y Morera, M. (2001). *Pruebas diagnósticas en Brucelosis bovina*. Recuperado de <http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/4/JER/INFOINTER/Pruebas%20diagnosticas%20en%20Brucelosis%20Bovina.pdf>.
3. Blood, D. & Henderson, J. & Radostits, O. (1982). *Medicina Veterinaria* (5 ed). México: Interamericana.
4. Dájer-Abimerhi A. y Gutiérrez R.E. y Zapata, V. (2003). *Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina*. Recuperado de <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb031416.pdf>.
5. Kahn, C. M. (9 Ed.) (2007). *Manual Merck de Veterinaria*. España: Editorial Océano.
6. Molinero, L. (2001). *Medidas de concordancia para variables cualitativas*. Recuperado de <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>.
7. Morera, M y Andrade M. (2005). *Prueba de Rosa de Bengala y/o Tarjeta en el Diagnóstico de Brucelosis Bovina*. Recuperado de <http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/4/JER/INFOINTER/Prueba%20de%20Rosa%20de%20%20Bengala.pdf>.

8. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2009). *Brucelosis Bovina*. Recuperado de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf.
9. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2014). *Análisis del riesgo asociado a las importaciones*. Recuperado de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_import_risk_analysis.htm#chaptre_import_risk_analysis_0.
10. Pfeiffer, C. (1999). *Mantenga su hato libre de brucelosis*. Recuperado de http://www.ugrj.org.mx/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=538.
11. Rebhun, W. (1995). *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia.
12. Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA). (2001). *Manual de Tecnicas de Laboratorio para el Diagnóstico en Salud Animal*. Recuperado de http://books.google.com.gt/books?id=WZcOAQAIAAJ&pg=PA18&lpg=PA18&dq=prueba+de+tarjeta+y+muestras+hemolizadas&source=bl&ots=G85Rli0Hjw&sig=M6zhSRiGEh0__vsTrFf3E4ilr20&hl=en&sa=X&ei=crZSVc7sFYyfgwSf24H4CQ&ved=0CCEQ6AEwATgK#v=onepage&q=prueba%20de%20tarjeta%20y%20muestras%20hemolizadas&f=false.
13. Stanchi, N. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Inter-Médica.
14. The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). (2009). *Brucelosis*. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf>.
15. Valera, R. y Sánchez, R. y Sánchez, A. y Benet, P. y Pérez, R. y Pulles, I. (9 de septiembre de 2005). *Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos*.

Revista Electrónica de Veterinaria Redvet, 6. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905/090503.pdf>.

16. Yah, D. (2012). *Brucella abortus* Rivanol Agglutination. Belize:BAHA.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS
CONTRA BRUCELOSIS EN HATOS BOVINOS DE LA REGIÓN DE
BLUE CREEK, ORANGE WALK, BELICE**

f. _____
Andre Angelo DePaz

f. _____
M.Sc. Fredy Rolando González Guerrero
ASESOR PRINCIPAL

f. _____
M.A. Carlos Enrique Camey Rodas
ASESOR

f. _____
Dra. Jacqueline Escobar Muñoz
EVALUADOR

IMPRÍMASE

f. _____
M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
DECANO